

UNIVERSIDAD NACIONAL DE PIURA

FACULTAD DE CIENCIAS

ESCUELA PROFESIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**“Evaluación del gen β -actina en *Arapaima gigas*
“paiche” como control interno de PCR en tiempo
real (qPCR)”**

Br. DANIELA GONZÁLEZ BARDALES

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL
DE BIÓLOGO**

Piura- Perú

2013



Br. DANIELA GONZÁLEZ BARDALES
AUTORA



Blgo - Mtblgo. JAIME FERNÁNDEZ PONCE
ASESOR



Blgo - Mtblgo. CÉSAR TORRES DÍAZ M.Sc
COASESOR



Dr. ROBERTO MENDOZA RENDON
PRESIDENTE



Blgo. ROBERT BARRIONUEVO GARCÍA
SECRETARIO



Blgo. RONALD MARCIAL RAMOS
VOCAL

A mi madre:

**Por todo el apoyo y el aliento
brindado en los momentos de debilidad.**

ÍNDICE GENERAL

	Pág.
INTRODUCCIÓN.....	1
MATERIAL Y MÉTODOS.....	12
Obtención de la muestra:.....	12
Identificación del gen β -actina.....	12
Extracción de ARN total de tejido:.....	12
Transcripción reversa-PCR (RT-PCR):.....	13
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):.....	14
Secuenciación:.....	15
Análisis de secuencias e identificación del gen:.....	15
Evaluación del gen β -actina.....	15
Purificación de productos de PCR:.....	15
Ligación del plásmido:.....	17
Competencia bacteriana:.....	18
Transformación de bacterias competentes:.....	19
Evaluación de bacterias transformadas:.....	19
Extracción de ADN plasmídico:.....	20
Primocultivos de células sanguíneas en <i>A. gigas</i> "paiche":.....	22
Inducción con lipopolisacáridos (LPS):.....	22
Extracción de ARN total a partir de cultivos de células sanguíneas.....	23

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR).....	24
Creación de la curva estándar:.....	25
RESULTADOS.....	26
Reacción en cadena de la polimerasa (PCR):.....	26
Análisis de secuencia e identificación del gen:.....	28
Transformación de bacterias competentes y obtención del ADN plasmídico:.....	30
PCR en tiempo real (qPCR):.....	32
DISCUSIÓN.....	35
CONCLUSIONES.....	38
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	39
ANEXOS	

ÍNDICE DE FIGURAS

	Pág.
Fig. 01: Obtención de la amplificación del gen β -actina de <i>Arapaima gigas</i>	27
Fig. 02: Análisis bioinformático con el algoritmo BLAST para comprobar similitud de la secuencia hallada y su identificación como parte de la proteína y sitio de unión a ATP perteneciente a la superfamilia actina.....	29
Fig. 03: Identificación de la secuencia aminoacídica como parte de la proteína y sitio de unión a ATP perteneciente a la superfamilia actina.....	30
Fig. 04: Mapa circular del vector p-GEM [®] -T-Easy y representación gráfica de la inserción de la secuencia de interés en el plásmido; barra roja sitio de inserción de la secuencia de interés, barra verde amplificación con iniciadores M13 del plásmido.....	31
Fig. 05: Obtención del amplicón de β -actina a partir una colonia de bacterias <i>E. coli</i> JM 109 transformada. M13 iniciadores para el plásmido (M13 ₁ amplificación del plásmido incluyendo la secuencia de interés insertada, M13 ₂ y M13 ₃ amplificación del plásmido sin la secuencia de interés); Act. Amplificación de la secuencia de interés.....	32

Fig. 06: Variación del nivel de expresión del gen β -actina en muestras control y muestras inducidas con lipopolisacáridos (LPS) a 0,5 pg/ml y 1,0 pg/ml.....	34
--	----

ÍNDICE DE CUADROS

	Pág.
Cuadro 01: Muestras utilizadas en la prueba de PCR en tiempo real.....	33

RESUMEN

La identificación del gen β -actina en *Arapaima gigas* "paiche" y su posterior evaluación como control interno de PCR en tiempo real (qPCR) se realizó utilizando la técnica de PCR convencional y PCR en tiempo real (qPCR) respectivamente. Se identificó el gen β -actina en *A. gigas* "paiche" a partir de tejido hepático; el fragmento hallado corresponde a un sitio conservado de unión a ATP; asimismo la evaluación de éste gen por qPCR demuestra que los niveles de expresión varían de acuerdo al tiempo en muestras control (de 16,5 copias/ μ l a 0,5 copias/ μ l a las 0 y 12 horas respectivamente) y en muestras inducidas con lipopolisacáridos (LPS) también se observa variación en los niveles de expresión (5,36; 20,5; y 0,49 copias/ μ l a las 2, 12 y 24 horas post inducción respectivamente). A partir de lo evaluado se concluye que el gen β -actina en *A. gigas* "paiche" no posee una expresión constante en condiciones normales y frente a una inducción con LPS en cultivos in vitro de células sanguíneas, por lo cual no se recomienda su uso como control interno de qPCR.

ABSTRACT

Identification of the β -actin gene in *Arapaima gigas* "paiche" and their subsequent evaluation as internal control in real-time PCR (qPCR) was performance by using the conventional PCR and real time PCR (qPCR) respectively. We identified the β -actin gene in *A. gigas* "paiche" from liver tissue, the fragment found corresponds to a site conserved ATP binding, further evaluation of this gene by qPCR demonstrates that expression levels vary according to the time control samples (16.5 copies / μ l at 0.5 copies / μ l at 0 and 12 hours respectively) and induced samples with lipopolysaccharide (LPS) were also observed variation in the expression levels (5,36; 5,20, and 0,49 copies / μ l at 2, 12 and 24 hours post induction, respectively). From the evaluation was concluded that the β -actin gene in *A. gigas* "paiche" does not have a constant expression in normal face to a induction with LPS in vitro cultures of blood cells, thus not recommended for using as internal control qPCR.

INTRODUCCIÓN

Las características geográficas y climáticas del Perú determinan una amplia gama de ventajas para el desarrollo de diversas actividades económicas, tanto sobre recursos no renovables como la minería metálica y no metálica, así como en los recursos renovables principalmente agricultura, ganadería, silvicultura y la acuicultura (Minag, 2011).

Mientras tanto los recursos hidrobiológicos mundiales se encuentran actualmente en el límite máximo de extracción. Ésta situación y el continuo crecimiento de la población mundial han generado la búsqueda de alternativas productivas, dentro de las cuales se encuentra la acuicultura, y es ésta una actividad que se va abriendo paso lentamente en el Perú (Flores, 2001).

La acuicultura peruana es bastante diversa, principalmente en sistemas de producción; pero poco significativa en comparación con otros países, y no precisamente asiáticos, sino latinoamericanos, donde esta actividad avanza y se consolida gracias a políticas y estrategias de desarrollo a largo plazo, algo que aún falta en nuestro país (PromPerú-Sunat, 2001).

Asimismo la acuicultura peruana se encuentra orientada al cultivo de pocas especies (Ministerio de la producción, 1993), sin embargo posee una potencialidad muy grande tanto el cultivo en la zona marítima con la crianza de ostras, conchas de abanicos, camarones, y otras especies; como en la zona continental basado en especies nativas con un amplio campo de desarrollo, particularmente en la macro-región Oriente con especies como el paiche, la gamitana, el boquichico, entre otros (Flores, 2001; Banco Wiese Sudameris, 2002).

Mientras tanto el desarrollo mundial de la acuicultura tiene como fundamento el desarrollo de tecnologías de reproducción artificial para la producción de alevines, semillas o post - larvas en cantidades suficientes, así como de la genética que permite el rápido crecimiento de los peces (lo que implica un menor costo de producción) y su resistencia a enfermedades (Banco Wiese Sudameris, 2002).

En la costa norte de nuestro país la Empresa Marinazul S.A., de iniciativa privada, se encuentra dedicada al sector acuícola en la producción de semilla certificada de langostinos y la crianza de langostinos, tilapia, e incursionando desde el año 2011 en la crianza de “paiche” *Arapaima gigas* y proyectándose a la producción del mismo.

El “paiche” *Arapaima gigas* (Schimtz, 1822), pertenece al Filo Chordata, Subfilo Vertebrata, Clase Actinopterygii, Orden Osteoglossiformes, Familia Osteoglossidae, Subfamilia Heterotidinae, Género Arapaima, Especie *A. gigas* (Sandoval, 2007).

A. gigas es una especie que habita en la región amazónica, los individuos pueden llegar a crecer hasta los 3 metros de longitud y pesar 200 kg. Generalmente poseen una coloración gris con un moteado naranja cerca del extremo posterior; el periodo de reproducción está ligado a los meses de enero, febrero y abril donde el nivel de inundación es relativamente bajo, sus nidos son contruidos en el fondo de las “cochas”, los nidos poseen una dimensión aproximada de 50 cm de ancho y 15 cm de profundidad (Lowe-McConnell, 1995; Alcántara, 1990), donde deposita un aproximado de 35-40 huevos, las crías al momento de la eclosión llegan a medir en promedio 2,5 cm, los progenitores muestran un comportamiento agresivo desde el momento del desove hasta la dispersión del cardumen seis meses post eclosión (Alcántara, 1990).

Ésta especie se distribuye de manera natural en América del Sur en la cuenca del río Amazonas y en los países considerados amazónicos como: Perú, Ecuador, Brasil, Colombia, Venezuela, Guyana, Surinam y Guayana Francesa. Asimismo puede ser encontrado en los afluentes del Amazonas

como son el río Madre de Dios (Perú) y el río Beni (Bolivia) (Lowe-McConnell, 1995).

Arapaima gigas se encuentra en la lista roja de la IUCN (2010) en la categoría de Casi Amenazado (EN). Ésta situación se puede deber tanto a la depredación directa de la especie como a la desaparición de un recurso, del cual ésta depende, tanto por la acción del hombre, debido a cambios en el hábitat, producto de hechos fortuitos (como desastres naturales) o por cambios graduales del clima.

Es una especie que posee una alta potencialidad científica y económica que ha soportado una intensa presión de pesca (Eléspuru, 2007) y como consecuencia sus poblaciones se han visto reducidas drásticamente (Montreuil, 2003), por lo que se vienen realizando diversos estudios relacionados a la crianza en cautiverio (Carazo y Guzmán, 1999), alimentación (Padilla, 2005) y expresión de genes asociados al estrés (Eléspuru, 2007); por otro lado el aspecto reproductivo no está aún bien estudiado. En ésta especie no existe dimorfismo sexual, lo cual dificulta grandemente la determinación del sexo de los individuos (Chu y William, 2010); sin embargo el Instituto de Investigaciones de la Amazonia Peruana (IIAP), ha realizado estudios para la determinación del sexo en esta especie

mediante la detección y cuantificación de la hormona Vitelogenina, la cual se detecta en plasma de hembras (Dugué *et al.*, 2010).

Asimismo a nivel mundial se realizan estudios genéticos en busca de una mejora en la producción, resistencia a enfermedades y mantenimiento de las especies más importantes comercialmente; dichos estudios genéticos utilizan pruebas sofisticadas como Northern blot, PCR en tiempo real, etc.; ésta última necesita de los llamados genes de referencia, normalizadores, genes de control interno o *housekeeping genes*; los genes de referencia son genes que se expresan constitutivamente y son mínimamente regulados, los cuales son usados en análisis cuantitativos de ARN debido a que la expresión de estos genes idealmente no es alterada por las condiciones experimentales. Estudios realizados sobre estos genes en tejidos de humanos (Santos *et al.*, 2008), mamíferos (Xu *et al.*, 2011), peces (Su *et al.*, 2011), virus y bacterias (Carrillo *et al.*, 2008), y plantas (Yan *et al.*, 2012); los genes de referencia más usados son EF1a, β -actina, 18S rRNA, Gliceraldehído-3 fosfato-deshidrogenasa (GAPDH), Tubulina 2 β ; sin embargo se debe tener en cuenta realizar una buena selección de los genes de referencia apropiados; por tal motivo se ha realizado éste estudio sobre el gen β -actina en *Arapaima gigas* “paiche”, para contar con un gen de referencia que pueda ser utilizado en estudios posteriores de análisis de expresión de genes, acorde con lo que se recomienda sobre la identificación y utilización de un gen de control

endógeno mas apropiado para cada tipo celular y en diferentes condiciones experimentales (Gallego, 2010).

El gen β -actina es un gen de aproximadamente 1897 nucleótidos en ADN complementario (ADNc) en *Siniperca chuatsi* “perca china”; que codifica para 375 aminoácidos (Liang *et al.*, 2011) posee expresión constitutiva puesto que es transcripcional y traduccionalmente activa en todas las células, independiente del tejido, órgano, edad u otra condición del organismo. Además codifica para una proteína altamente conservada en eucariotas, que juega un papel crucial en el mantenimiento del citoesqueleto (Venkatesh, 1996; Zabaleta *et al.*, 2008), contracción muscular, motilidad celular, división celular, transporte intra celular y diferenciación celular (Herman, 1993). Se han descrito seis isoformas de actina, agrupadas en cuatro actinas musculares (α -actina en tejido muscular cardiaco, α -actina en tejido musculara esquelético, α -actina en tejido muscular liso vascular y γ -actina en tejido muscular liso visceral) y dos actinas no musculares o actinas citoplasmáticas (β -actina y γ -actina) (Lázaro, 2008).

El gen β -actina ha sido analizado y clonado en diversos organismos como “carpa común” *Cyprinus carpio* (Liu *et al.*, 1990), “pez globo” *Fugu rubripes* (Venkatesh, 1996), “dorada” *Sparus aurata* (Santos *et al.*, 1997), *Rivulus marmoratus* (Lee, 2000), “lenguado” *Platichthys flesus* (Lee, 2000), “besugo

rojo" *Pagrus major* (Choi y Takashima, 2000), "mero de manchas naranjas" *Epinephelus coioides* (Zhang *et al.*, 2006), "perca china" *Siniperca chuatsi* (Liang *et al.*, 2011), *Rhodeus notatus* y "carpa plateada" *Hypophthalmichthys molitrix* (Hwang *et al.*, 2002). Asimismo se ha estudiado la expresión del gen β -actina en *Menidia estor* "pez blanco mejicano" en diferentes órganos como testículos, ovario, cerebro e hígado, encontrando que se expresa en todos estos tejidos debido a que es un gen relacionado con los mecanismos celulares por lo que está presente en todo el organismo (Rodríguez, 2011); además se realizó estudios del gen β -actina en *Rivulus marmoratus* y al comparar los resultados de la caracterización de este gen con diferentes especies de peces (salmón del atlántico [AF012125], carpa común [M24113], carpa herbívora [M25013], dorada [X89920], zebrafish [AF025305] y medaka [S74868]), y humano [AB004047] se halló, que se encuentra altamente conservado, esto se debe a que β -actina participa en la motilidad y estructura celular (Lee, 2000).

También se realizaron estudios sobre la sensibilidad de los genes constitutivos gliceraldehído-3fosfato-deshidrogenasa (GAPDH), β -actina y 18S ribosomal RNA (18S rRNA), en dietas en los periodos pre y postnatales en ratones llegando a la conclusión que tanto 18S rRNA como β -actina sirven como controles internos adecuados para el estudio de expresión de genes debido a que no varían su expresión en diferentes tratamientos y periodos

(Sellayah *et al.*, 2008); sin embargo estudios realizados en fibroblastos estimulados con suero, se observó una mayor expresión en los genes β -actina y gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), mientras que los genes 18S y β -2-mioglobina mantienen una expresión constante (Schmittgen y Zakrajsek, 2000); además, se realizaron estudios en la selección de genes como control interno en colonia de tejidos humanos por la técnica de transcripción reversa de la reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (RT-qPCR), donde se evaluó los genes GAPDH, β -actina, 18S rRNA, hallando que de los tres genes estudiados, 18S rRNA es el que posee expresión estable, mientras que los genes GAPDH y β -actina poseen una expresión diferencial en los tejidos en estudio (Tsuji *et al.*, 2002).

La técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se basa en la amplificación específica de fragmentos de ADN usando un par de iniciadores, ADN molde, nucleótidos, cloruro de magnesio y la enzima ADN polimerasa que sometidos a diferentes condiciones cíclicas de temperatura, que comprende una fase de desnaturalización del ADN que se produce a una temperatura que oscila entre los 94 a 96°C, una fase de hibridación de los iniciadores a una temperatura entre los 55 a 72°C, una fase de extensión o polimerización que consiste en la generación de la cadena de ADN complementaria por acción de la enzima ADN polimerasa generalmente se da a una temperatura de 72°C; todo éste proceso permite la amplificación in

vitro de los múltiples fragmentos de ADN (Mullis y Faloona, 1987; Luque y Erraes, 2001; Mas *et al.*, 2001; Tevfik, 2006; Pray, 2008).

La técnica de PCR es utilizada extensivamente en el diagnóstico de enfermedades de origen genético, la detección de secuencias de ADN pertenecientes a organismos patógenos presentes en muestras clínicas, la identificación genéticas de muestras forenses y el análisis de mutaciones en oncogenes activados; asimismo la amplificación por PCR es utilizada en una gran variedad de etapas en la clonación y análisis de ADN; así tenemos, la generación de secuencias específicas de ADN bicatenario clonado para utilizarlo como sonda, la generación de sondas específicas para genes no clonados por amplificación selectiva de un segmento particular de ADN complementario (ADNc), la generación de bibliotecas de ADNc desde pequeñas cantidades de ARN mensajero (ARNm), la generación de grandes cantidades de ADN para secuenciación, y finalmente el análisis de mutaciones.

En los últimos años se han desarrollado nuevas técnicas moleculares de tipificación basadas en la PCR que han supuesto un importante avance en el estudio de las enfermedades infecciosas (Becerra, 2000), y en poco tiempo esta técnica ha conseguido ser ampliamente utilizada aplicando la genética molecular en el campo de acción de otras ciencias (Mas *et al.*, 2001).

Una de las variantes más importante de la PCR es la PCR cuantitativa (PCR en tiempo real o qPCR), que al igual que la PCR convencional hace uso de ADN; por lo tanto el primer paso es obtener los ácidos nucleicos (ADN o ARN) a partir de muestras biológicas, una vez obtenida las muestras de ADN es preciso contar con los iniciadores específicos para le secuencia diana a amplificar en presencia de KCl, Tris-HCl, Taq DNA polimerasa, $MgCl_2$, dNTP (dATP, dCTP, dGTP, y dTTP), y fluorocromo (como sistema de detección); todos estos componentes se unen en un mix, se colocan en el equipo especial para PCR en tiempo real y se configura el programa a usar (Costa, 2004).

En la qPCR se puede evaluar la evolución de la amplificación durante la corrida del ensayo, ésta se muestra en el gráfico denominado curva de amplificación, el cual consta de tres fases: fase exponencial o logarítmica, fase lineal y fase de platea. Existen dos tipos de cuantificación usadas en qPCR; la cuantificación absoluta y la cuantificación relativa; con la primera se obtiene un resultado en número de copias del gen de interés. Este método implica la utilización de un gen inserto en un plásmido y el gen a evaluar debe ser el mismo o debe tener características similares a éste (cantidad de G-C; longitud). En el caso de la cuantificación relativa el resultado obtenido es la comparación mayor o menor en número de copias en relación al gen de referencia (Costa, 2004; Mas *et al.*, 2001).

La qPCR es altamente útil debido a que los procesos de amplificación y detección se producen de manera simultánea en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior. Además, mediante detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación en tiempo real (Costa, 2004); ésta técnica se aplica en la evaluación de la expresión, de genes, en el análisis de mutaciones y en la cuantificación (número de copias), etc. (Mas *et al.*, 2001).

Ésta investigación tuvo como objetivo la evaluación de la expresión del gen β -actina de *Arapaima gigas* como control interno de qPCR y la identificación y caracterización parcial del gen β -actina en *Arapaima gigas*.

MATERIAL Y MÉTODOS

Obtención de la muestra

Para la identificación del gen β -actina se trabajó con muestras de hígado de dos especímenes de *Arapaima gigas* "paiche" de aproximadamente 20 a 30 kg de peso total, con una edad de 1 año 9 meses, pertenecientes a los cultivos de la empresa Marinazul S.A., los cuales fueron destinados para venta.

Para la evaluación de la expresión del gen β -actina se emplearon 7 alevines de *Arapaima gigas* "Paiche", de aproximadamente 8 meses de edad y 500 gr de peso; a los cuales se les extrajo muestras de sangre por punción caudal utilizando jeringas de 10 ml conteniendo la solución Alsever (cloruro de sodio 0,42%, citrato de sodio 0,8%, glucosa 2,05%, ácido cítrico 0,05% y agua destilada, todo esterilizado por filtración 45-0,22 μ m) en proporción 1:1 (v/v), la muestra de sangre rápidamente fue colocada en hielo y trasladada al área de cultivo celular del centro de investigación de biología molecular BIOTEC CMC – Marinazul S.A.

I. IDENTIFICACIÓN DEL GEN β -ACTINA

Extracción de ARN total de tejido

La extracción de ARN total a partir de muestras de hígado se realizó usando el protocolo de extracción de Trizol (Ambion), con ligeras modificaciones.

Se homogenizó una muestra de tejido de aproximadamente 50 a 100 mg, se adicionó 1 ml de Trizol se maceró y se dejó reposar por 5 min. Luego se centrifugó a 12 000 g por 10 min a 4°C, se transfirió del sobrenadante a un microtubo nuevo y se adicionó 200 µl de cloroformo, se homogenizó suavemente por 15 segundos y se incubó en frío por 15 min, luego se centrifugó a 12 000 g por 8 min a 4°C y se transfirió la fase acuosa a un tubo nuevo, se adicionó 500 µl de isopropanol helado, se homogenizó por inversión por 5 seg y se incubó por 30 min en refrigeración.

Posteriormente se centrifugó la muestra a 12 000 g por 8 min a 4°C. Se adicionó 1 ml de etanol al 75%, se centrifugó a 7 500 g por 5 min a 4°C y finalmente se resuspendió el pellet de ARN en 11 µl de agua ultrapura libre de nucleasas a 60°C.

Seguidamente se realizó el tratamiento con ADNasa que consistió en preparar un mix de 1 µl Buffer de DNASA I [10x], 1µl MnCl₂ 100 mM, 1,5 µl DNASA I [1 U/µl] y adicionarlo a la muestra de ARN obtenida y se incubó a 37°C por 30 min y finalmente a 65°C por 10 min y rápidamente se realizó la RT – PCR.

Transcripción Reversa – PCR (RT- PCR)

La primera cadena de ADN se obtuvo a partir del ARN total extraído de tejido hepático de *A. gigas* y la subsiguiente PCR, utilizando los reactivos

RevertAid™ Reverse Transcriptase (Fermentas®) y siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante

Se colocó en un tubo de PCR (0,2 ml) 5 µl de muestra de ARN, se adicionó 1 µl de oligo dT [0,5 µg/µl] y se aforó con agua ultra pura libre de nucleasas a 12,5 µl, todo el mix anterior se colocó en el termociclador (Veriti 96-Applied Biosystems) a 65°C por 5 min. Luego se adicionó 4 µl de reaction buffer [5x], 0,5 µl RiboLock™ RNASE inhibitor [40 µg/µl], 2 µl de dNTP Mix [10 mM], 1 µl RevertAid™ Reverse Transcriptase [200 u/µl] (Fermentas®) y finalmente se colocó en el termociclador (Veriti 96-Applied Biosystems) utilizando la programación de 42°C por 55 min, 72 °C por 15 min y a 4 °C ∞.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

En la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se utilizó el protocolo recomendado; se le agregó 25 µl de master mix [2x] (Fermentas®), 1 µl de cada cebador [20 µM] SGAF86 (forward) y SGAR87 (reverse) (Su *et al.*, 2009), 15 µl de agua libre de nucleasas y 1 µl de ADNc. La mezcla preparada se colocó en el termociclador con las condiciones de PCR de un ciclo de 95 °C por 5 min, 35 ciclos de 95 °C por 30 seg, 60°C por 30 seg, 72°C por 1 min, 72°C por 7 min y finalmente 4°C. El producto de amplificación se corrió en gel de agarosa 1,5% teñido con bromuro de etidio y la lectura se realizó en transiluminador UV.

Secuenciación

El producto de amplificación obtenido se diluyó en agua ultra pura libre de nucleasas [10^{-1}] y se envió a la empresa MacroGen para la secuenciación.

Análisis de secuencias e identificación del gen

El análisis se realizó *in silico* (vía simulación computacional) comparando la secuencia obtenida con la secuencia del gen β -actina de la base de datos de la NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>), utilizando el programa web BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

II. EVALUACIÓN DEL GEN β -ACTINA

Purificación de productos de PCR

La purificación del producto de PCR se realizó utilizando el kit Silica Bead DNA Gene Extracction (Fermentas) y siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

Con una hoja de bisturí se cortó el trozo de gel que contiene la banda de PCR a purificar, el trozo de gel se colocó en un microtubo de 1,5 ml (previamente pesado) y se volvió a pesar anotando el peso de gel por diferencia de pesos; se adicionó 1:3 (peso/vol) de binding buffer al microtubo que contiene el trozo de gel y se incubó la mezcla a 55°C por 5 min hasta que el trozo de gel estuvo disuelto, se mezcló por inversión cada cierto tiempo para facilitar el proceso de fusión, se observó la coloración de la

solución que fue de color amarillo, que indica un pH óptimo para la unión al ADN, luego se adicionó 5 µl de Silica Powder Suspension a la mezcla de ADN/buffer de unión y se incubó la mezcla por 5 min a 55°C y para permitir la unión del silica con el ADN se colocó en vortex a cada momento, luego se realizó un *spin* al complejo silica powder/DNA por 5 seg para formar un pellet, se removió y se descartó con cuidado la solución sobrenadante.

Posteriormente se le adicionó 500 µl de *washing Buffer* frío y se resuspendió el pellet, luego se realizó un pequeño spin por 5 seg y se descartó el sobrenadante. Este procedimiento se repitió tres veces; después que el sobrenadante del último lavado se removió, se realizó un spin y se eliminó el líquido restante por pipeteo.

Finalmente, el pellet se resuspendió en 30 µl de agua ultra pura y se incubó a 55°C por 5 min. Se realizó un spin y el sobrenadante se trasladó a un microtubo nuevo; este paso se volvió a repetir con un volumen de 20 µl de agua ultra pura y el sobrenadante se colocó junto con el producto recuperado anteriormente; por último para remover los residuos de silica powder se realizó un spin por 30 seg y se transfirió el sobrenadante a un microtubo nuevo y se almacenó a -20°C hasta su uso.

Ligación del plásmido

Para la ligación del plásmido pGEM®-T Easy se realizó siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante. Se centrifugó brevemente el vector pGEM® – T Easy y el tubo control de ADN para colectar el contenido en el fondo del tubo.

Las reacciones de ligación se establecieron

Agregando 5 µl de 2X Rapid Ligation Buffer, 1 µl de pGEM®-T Easy Vector (50 ng), 3 µl de producto de PCR, y 1 µl de enzima T4 DNA Ligasa.

Para el control positivo se agregó 5 µl de 2X Rapid Ligation Buffer, 1 µl de pGEM®-T Easy Vector (50 ng), 2 µl de inserto de control de ADN, 1 µl de enzima T4 DNA Ligasa y 1 µl de agua libre de nucleasas.

Para el control negativo se agregó 5 µl de 2X Rapid Ligation Buffer, 1 µl de pGEM®-T Easy Vector (50 ng), 1 µl de enzima T4 DNA Ligasa y 3 µl de agua libre de nucleasas.

Antes de cada uso el tubo conteniendo 2X Rapid Ligation Buffer se pasó por vórtex vigorosamente.

Se mezcló la reacción por pipeteo y se incubó por una hora a temperatura ambiente; luego de esto el plásmido ligado se almacenó a -20°C hasta su uso.

Competencia bacteriana

Para realizar la competencia bacteriana se sembró la cepa bacteriana *E. coli* JM109 en 1 ml caldo LB para reactivarla y se dejó incubar a 37 °C por 12 a 24 horas.

Se tomó una colonia y se sembró en placas con agar LB mediante la técnica de agotamiento por estrías, y se incubó por 12 h; de ésta siembra se cogió una colonia y se colocó en 7 ml de medio LB y se incubó toda la noche a 37°C. Posteriormente se tomó 250 µl del cultivo y se colocó en 25 ml de caldo LB en tubos plásticos de 50 ml; se dejó incubar a 37°C en baño maría con agitación, hasta que la densidad óptica (OD600) sea de 0,6; se dejó enfriar por 10 min; luego se centrifugó a 8 000 rpm por 10 minutos a 4°C, se descartó el sobrenadante cuidadosamente y el pellet se resuspendió en 10 ml de MgCl₂ 0,1 M y se incubó por 10 min. en hielo, luego se centrifugó a 4 000 rpm por 10 min. a 4°C, nuevamente se descartó el sobrenadante y se resuspendió el pellet en 10 ml de CaCl₂ 0,05 M en frío y se incubó por 20 minutos a 4°C, se volvió a centrifugar a 4 000 rpm por 10 minutos a 4°C y el pellet se disolvió en 2,5 ml de CaCl₂ 0,1 M. Finalmente las bacterias competentes se alicuotaron en microtubos de 1,5 ml, un volumen de 500 µl en cada uno, se sellaron con parafilm y se almacenaron a 4°C hasta el momento de su uso (la competencia bacteriana a ésta temperatura sólo dura 3 a 4 días).

Trasformación de bacterias competentes

Se colocó en un microtubo de 1,5 ml, 25 μ l de las células bacterianas competentes en proporción 1:1 con medio LB y se acomodó sobre hielo, luego se agregó 2 μ l del plásmido ligado, se mezcló muy suavemente y se colocó en hielo por 20 min.

El shock térmico se realizó cuando se llevó la mezcla a baño seco a 42°C por 90 seg. e inmediatamente se colocó en hielo por 5 min. Luego se le agregó 400 μ l de caldo LB, se homogenizó y se dejó incubando por 3 horas a 37°C.

Evaluación de bacterias transformadas

Para la evaluación de bacterias transformadas se preparó Isopropil- β -1-D-tiogalactopiranosido (IPTG); se pesó 23,83 mg de IPTG y se diluyó en 1 ml de agua destilada y se esterilizó por filtración.

Luego se preparó 5-Bromo 4-Cloro-3-Indol- β -D-Galactopiranosido (X-Gal); se pesó 50 mg de X-Gal y se resuspendió en 2 ml de dimetil sulfóxido (DMSO).

Además se preparó Agar LB suplementado con ampicilina/X-Gal/IPTG; se agregó al agar LB (cloruro de sodio 1%, triptona 1%, extracto de levadura 5%, agar 1,5%), (aún no gelificado), ampicilina a una concentración final de 100 μ g/ml, al mismo tiempo se le agregó IPTG hasta una concentración final de 0,5 mM y X-Gal hasta una concentración final de 80 μ g/ml; se dejó solidificar por 30 min. y se sembró en placas. Cada micro tubo conteniendo

bacterias transformadas se homogenizó y se tomó una alícuota de la suspensión y se sembró en placa por la técnica de agotamiento por estrías. Todas las placas sembradas fueron incubadas toda la noche a 37°C.

Masificación de bacterias transformadas

Se observó las placas sembradas y se tomó una colonia de interés y sembró en un tubo con 10 ml de caldo LB con ampicilina y se incubó a 37°C por 12 a 16 horas en movimiento constante.

Extracción de ADN plasmídico

La extracción de ADN plasmídico se realizó utilizando el kit GeneJET™ plasmid miniprep (Fermentas) y siguiendo el protocolo recomendado por el fabricante.

A partir de la masificación de las bacterias transformadas se centrifugaron a 10 000 rpm por 5 min y se descartó el sobrenadante.

Se resuspendió por pipeteo el pellet de células en 250 µl de solución de resuspensión y se transfirió las células a un micro tubo de 1,5 ml.

Se adicionó 250 µl de solución de lisis y se mezcló completamente por inversión 6 veces hasta que la solución se volvió viscosa y ligeramente clara.

Se adicionó 350 µl de la solución de neutralización y se mezcló inmediatamente por inversión 6 veces, luego se centrifugó a 14 000 rpm por 5 min para sedimentar los restos celulares y ADN cromosomal; se transfirió el

sobrenadante a una columna proporcionada en el kit GeneJET™ evitando transferir el precipitado blanquecino.

Se centrifugó a 14 000 rpm por un minuto y se descartó la solución filtrada.

Se adicionó a la columna 500 µl de la solución de lavado (1,7 ml de etanol al 96% y 1 ml de *wash solution* concentrada), se centrifugó a 14 000 rpm por 60 seg, se descartó la solución filtrada y se volvió a repetir el paso de lavado.

Se descartó el filtrado y se centrifugó por un minuto adicional para remover el residuo de la solución de lavado, este paso es esencial para eliminar el etanol residual en el plásmido.

Se transfirió la columna a un micro tubo de 1,5 ml, y se adicionó 30 µl de buffer de elución para liberar el ADN plasmídico de la membrana (se tuvo cuidado de no tocar la membrana con el tip de la pipeta), se incubó por 2 min a temperatura ambiente y se centrifugó a 14 000 rpm por 2 minutos.

Finalmente se descartó la columna y a partir del filtrado se realizó la cuantificación de ADN plasmídico extraído. Luego se procedió a realizar diluciones sucesivas 10^{-1} 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} las cuales fueron almacenados a -20°C hasta su respectivo uso en la obtención de la curva estándar en qPCR.

Primocultivo de células sanguíneas de *Arapaima gigas* “paiche”

El cultivo de células sanguíneas se realizó en medio L15 (350 ml); para la preparación de éste medio se pesó 4,48 gr de medio L15, y se le adicionó

estreptomycin 100 µg/ml, gentamicina 100 µg/ml, anfotericina 2,5 µg/ml, ampicilina 100 µg/ml, Hepes 10 mM, solución Hank's 0,3 X, suero bovino fetal 10%, y se aforó a 350 ml con agua destilada autoclavada, y se esterilizó por filtración a 0,22 µm y finalmente se le ajustó el pH a 7,0 – 7,5.

Se trabajó en frascos de cultivo de 75 cm² de área (Nuncion®) a los cuales se les adicionó 1 ml de medio y se esparció en la toda la base; seguidamente se le adicionó 200 µl de sangre total (anteriormente extraída). Finalmente se le adicionó 4 ml de medio de cultivo adicionales y se homogenizó.

Inducción con lipopolisacáridos (LPS)

Las concentraciones del inductor fueron de 1 pg/ml y 0,5 pg/ml; para lo cual se realizó una siembra de 200 µl de sangre total en frascos de cultivo de 75 cm² (Nuncion®) conteniendo 5 ml de medio de cultivo M15.

Extracción de ARN a partir de cultivos de células sanguíneas

Se tomó el primocultivo, se pipeteó para despegar las células adheridas, se colocaron en micro tubos de 1,5 ml, se centrifugaron a 10 000 rpm por 10 min, luego se eliminó el sobrenadante; las células se colectaron en un solo micro tubo, se le agregó 100 µl de trizol y se homogenizó, luego se le adicionó 650 µl de trizol y se homogenizó por inversión; seguidamente se le agregó 20 µl de ácido acético 5 N, y se colocó en vórtex por 15 seg. y se dejó

reposar en hielo por 15min; posteriormente se adicionó 200 µl de cloroformo y se homogenizó por inversión suavemente, se dejó reposar en hielo por 10min, luego se centrifugó a 12 000 g por 15 min a 4°C, se traspasó el sobrenadante a un micro tubo nuevo de 1,5 ml se agregó 500 µl de isopropanol helado se homogenizó por inversión suavemente y se dejó reposar en refrigeración por 10 min, seguidamente se centrifugó a 12 000 g por 8 min a 4°C; se descartó el sobrenadante y se agregó 1 ml de etanol al 75%, se homogenizó suavemente por inversión y se centrifugó a 8 000 g por 5 min a 4°C. luego se descartó el etanol y se dejó secar en mechero por 2 a 3 min. Finalmente se resuspendió en 10 µl de agua ultra pura a 65°C.

Tratamiento con DNAsa

Al ARN extraído se le adicionó 1 µl de buffer de DNAsAI, 1µl de cloruro de manganeso y 1,5 µl de DNAsa I, y se incubó a 37°C por 30 min. Luego se le adicionó 1 µl de EDTA y se incubó a 65°C para inactivar la enzima.

Posteriormente se realizó la cuantificación del ARN extraído y la normalización del mismo a una concentración de 20 ng/µl para así descartar que la cantidad inicial de ARN en la muestra interfiera en la cuantificación de la expresión del gen; se debe tener en cuenta que sólo se obtuvo resultados de cuantificación de 11 de las 32 muestras analizadas (ver anexos), a las cuales se les realizó la retrotranscripción a ADN complementario (cDNA).

Reacción en cadena de la polimerasa en tiempo real (qPCR)

Una vez obtenida la muestra de cDNA se preparó un mix de reactivos para realizar la técnica de Real Time PCR (qPCR) como sigue, se agregó 4,5 µl de H₂O libre RNAsa; 7,5 µl de SuperMix SYBR Green; 1,0 µl de primer sentido del gen β-actina, 1,0 µl del primer antisentido para el β-actina; luego se colocó 14 µl de la mezcla en cada pocillo de una placa y se le agregó 1,0 µl de ADNc; se cubrió toda la placa con una lámina adhesiva evitando tocar por encima la lámina e interferir en la detección de la fluorescencia, luego se colocó la placa en el termociclador en Tiempo real LightCycler® 480 marca Roche.

Finalmente se programó las condiciones del programa de PCR en tiempo real como sigue: fase de activación 95°C por 5 min, seguido de una fase de amplificación de 40 de PCR a 95°C por 15 seg, 62°C por 10 seg, y 72°C por 10 seg. Luego el análisis de la curva de melting que fue realizado bajo las siguientes condiciones: 30 seg de desnaturalización a 95°C, 30 seg de hibridación a 55°C seguido por 1 600 ciclos con temperaturas de hibridación incrementadas en 0.06°C, comenzando a 55°C con lecturas de fluorescencia continuos.

Elaboración de la curva estándar

Con el ADN plasmídico obtenido y cuantificado se realiza diluciones decimales sucesivas 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} . Estas muestras hicieron las veces de ADN para la prueba; se preparó el número de reacciones y se colocó en la placa de trabajo; luego esta se introdujo en el equipo de real time LightCycler480 II- Roche, y se ajustaron los parámetros de ciclos y temperatura.

RESULTADOS

Los resultados obtenidos de las pruebas realizadas son los siguientes

I. Identificación del gen β -actina de *Arapaima gigas*

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

Se realizó la amplificación de un segmento del gen β -actina de *Arapaima gigas* utilizando los iniciadores específicos (ver anexos); La amplificación obtenida se envió a secuenciar a la empresa MacroGene y el resultado obtenido fue un producto de 135 pares de bases (pb).

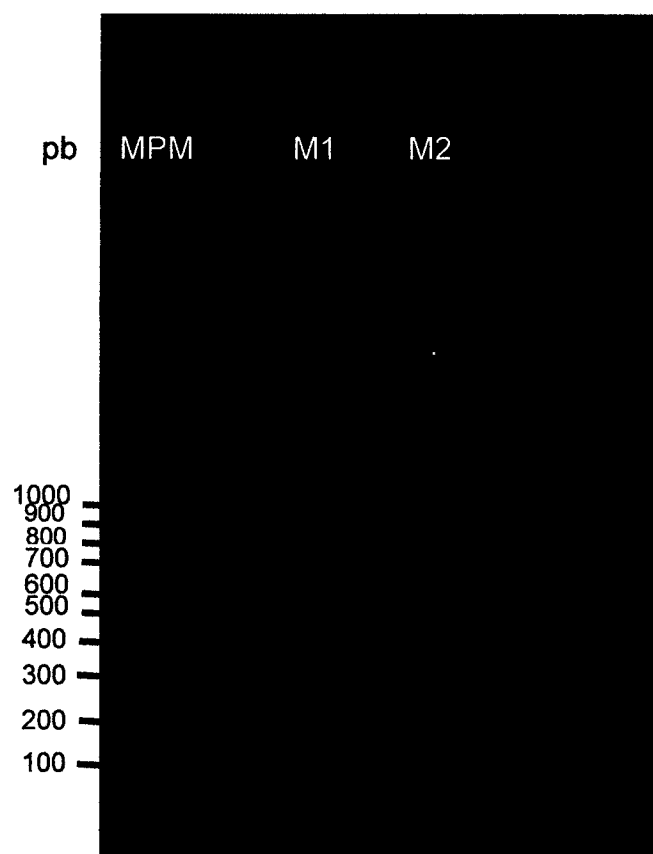


Fig. 01: Obtención de la amplificación del gen β -actina a partir de tejido hepático de dos individuos de *Arapaima gigas* (M1 y M2).

Análisis de secuencia e identificación del gen

Como se dijo anteriormente el tamaño del amplicón obtenido fue de 135 pb, el cual codifica para un fragmento de 45 aminoácidos (Aa) de una parte de la proteína β -actina que está conformada por 375 Aa; se debe resaltar que la secuencia hallada del gen en estudio (β -actina de *Arapaima gigas*) no se muestra en los resultados por razones de propiedad de la empresa Marinazul S.A.

Con los resultados obtenidos se realizó un análisis mediante el programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local (Basic Local Alignment Search Tool BLAST) (Fig. 02) obteniéndose como resultado de la comparación que la porción amplificada comprende parte del sitio activo de unión a ATP de la proteína perteneciente a la súperfamilia actina (Fig. 03); ésta secuencia encontrada concuerda con el gen β -actina de diferentes especies tanto de peces, mamíferos e insectos.

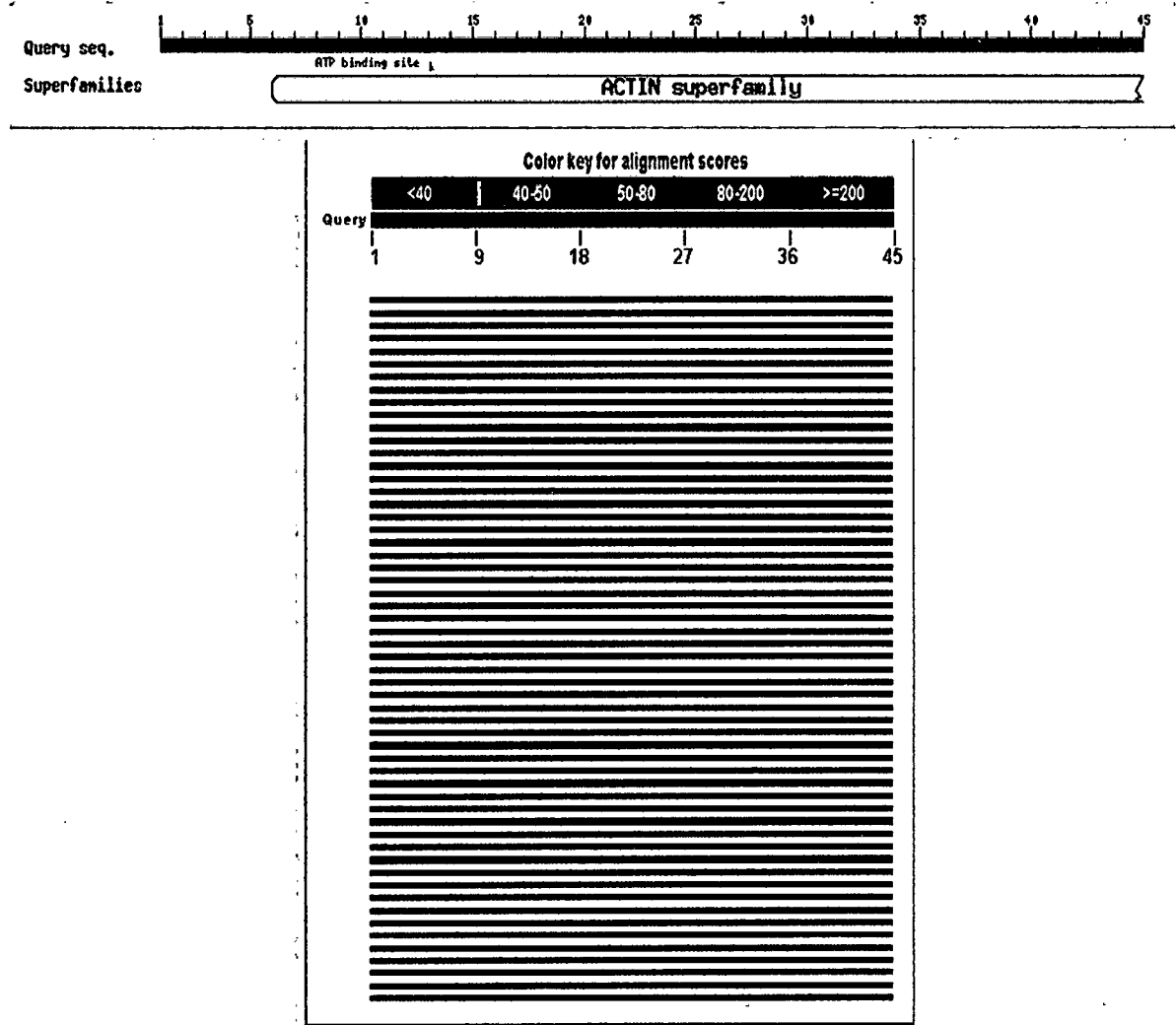


Fig. 02: Identificación de la secuencia aminoacídica como parte de la proteína y sitio de unión a ATP perteneciente a la superfamilia actina.

Accession	Description	Max score	Total score	Query coverage	E value	Max ident
ABK20356.1	beta-actin, partial [Tanichthys albonubes] >gb ABK20358.1 beta-actin	87.2	87.2	93%	3e-20	100%
AAS55431.1	beta-actin [Labeo rohita]	87.2	87.2	93%	7e-20	100%
ABK20357.1	beta-actin, partial [Oreochromis niloticus]	84.6	84.6	93%	3e-19	96%
ABD83882.1	cytoskeletal beta actin [Ictalurus punctatus]	87.2	87.2	93%	3e-19	100%
AFE55711.1	beta-actin, partial [Rhodeus uyeikii]	87.2	87.2	93%	2e-18	100%
EGT30044.1	hypothetical protein CAEBREN_16354 [Caenorhabditis brenneri]	84.6	84.6	93%	3e-18	96%
XP_002039673.1	GM15786 [Drosophila sechellia] >gb EDW56538.1 GM15786 [Drosophila]	84.6	84.6	93%	3e-18	96%
AAA27887.1	actin, partial [Caenorhabditis elegans] >gb AAA27889.1 actin, partial	84.6	84.6	93%	4e-18	96%
ABP35641.1	beta-actin [Gobiocypris rarus]	87.2	87.2	93%	4e-18	100%
CAF96433.1	unnamed protein product [Tetraodon nigroviridis]	87.2	87.2	93%	4e-18	100%
AEK69350.1	beta-actin [Elopichthys bambusa]	87.2	87.2	93%	4e-18	100%
AAI67544.1	LOC100170531 protein [Xenopus (Silurana) tropicalis]	87.2	87.2	93%	4e-18	100%
ABV48739.1	beta-actin [Tanichthys albonubes]	87.2	87.2	93%	4e-18	100%
ABV48738.1	beta-actin [Tanichthys albonubes]	87.2	87.2	93%	4e-18	100%
BAD88412.1	beta cytoplasmic actin [Pagrus major]	87.2	87.2	93%	4e-18	100%
AAQ05018.1	beta-actin [Tigriopus japonicus]	87.2	87.2	93%	4e-18	100%
AAQ05017.1	beta-actin [Tigriopus japonicus]	87.2	87.2	93%	4e-18	100%
AAG17453.1	beta-actin [Rhodeus notatus]	87.2	87.2	93%	4e-18	100%
AAL57317.1	beta-actin [Labeo calbasu]	87.2	87.2	93%	4e-18	100%
AAG17452.1	beta-actin [Hypophthalmichthys molitrix]	87.2	87.2	93%	4e-18	100%
NP_853632.2	actin, cytoplasmic 2 [Danio rerio] >gb AAH45879.1 Bactin2 [Danio rerio]	87.2	87.2	93%	4e-18	100%
AAF63665.1	beta-actin [Platichthys flesus] >gb AAP93862.1 beta-actin [Perca fluviatilis]	87.2	87.2	93%	4e-18	100%
AAF63669.1	beta-actin [Phoxinus phoxinus]	87.2	87.2	93%	4e-18	100%
AAY25518.1	beta-actin [Cirrhinus molitorella] >gb ABB40594.1 beta-actin [Cirrhinus]	87.2	87.2	93%	4e-18	100%
NP_001003349.1	actin, cytoplasmic 2 [Canis lupus familiaris] >gb AAB71610.2 beta-actin	87.2	87.2	93%	4e-18	100%

Fig. 03: Análisis bioinformático con el algoritmo BLAST para comprobar similitud de la secuencia hallada.

Transformación de bacterias competentes y obtención del ADN plasmídico

La cepa bacteriana *E. coli* JM 109 se volvió competente utilizando el método químico, luego se le insertó el plásmido (pGEM-T Easy (Promega) ligado al producto de PCR purificado (Fig. 04), y se realizó la comprobación de la transformación por medio de PCR convencional utilizando primers específicos para el gen β -actina y para el plásmido (Fig. 05).

A partir de la masificación de las bacterias transformadas y la extracción del ADN se obtuvo 1.9638×10^{10} moléculas/ μ l de ADN plásmídico (ver anexos). Al cual se realizó diluciones sucesivas para la obtención de la curva estándar.

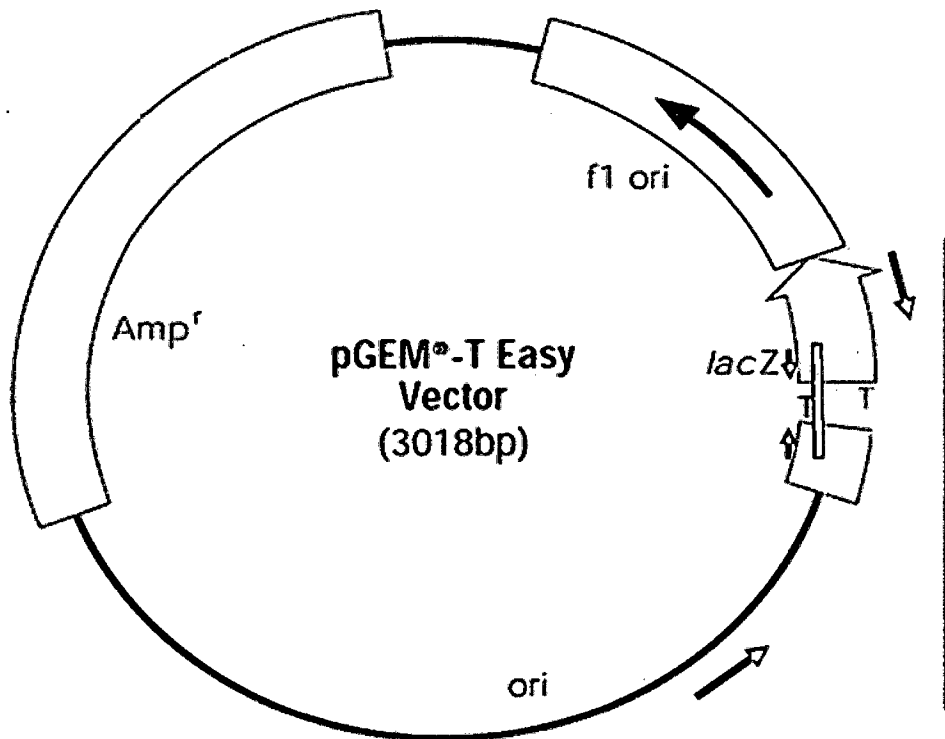


Fig. 04: Mapa circular del vector p-GEM®-T-Easy y representación gráfica de la inserción de la secuencia de interés en el plásmido; barra roja sitio de inserción de la secuencia de interés, barra verde amplificación con iniciadores M13 del plásmido.

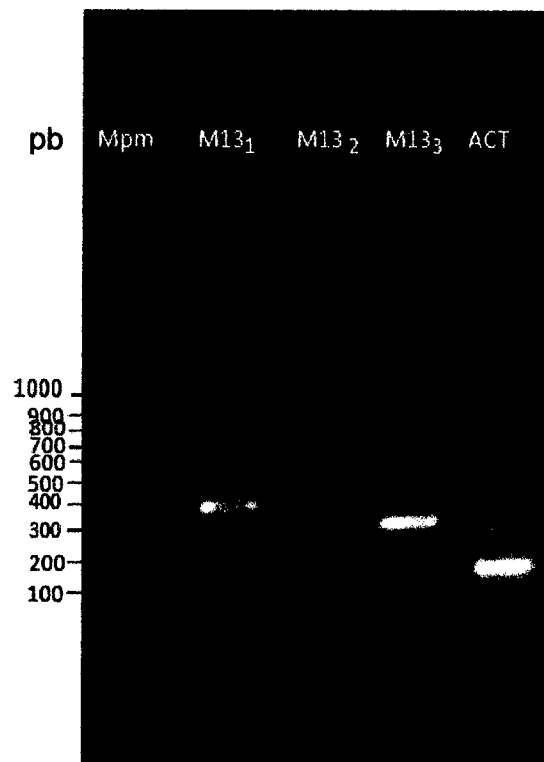


Fig.05: Obtención del amplicón de β -actina a partir una colonia de bacterias *E. coli* JM 109 transformada. M13 iniciadores para el plásmido (M13₁ amplificación del plásmido incluyendo la secuencia de interés insertada, M13₂ y M13₃ amplificación del plásmido sin la secuencia de interés); Act. Amplificación de la secuencia de interés.

II. Evaluación del gen β -actina

PCR en tiempo real (qPCR)

A partir de las 11 muestras de las cuales se obtuvieron datos de cuantificación de ARN, sólo se consiguió datos de amplificación y cuantificación por real time PCR (qPCR) de 8 muestras (que se detallan en el cuadro siguiente).

Cuadro 01: Muestras utilizadas en la prueba de PCR en tiempo real

Tiempo Tratamiento	0h	2h	4h	12h	24h	48h
Control	x			x		
0,5pg/ml		x		x	x	
1,0pg/ml			x	x		x

En la evaluación de los niveles de expresión del gen β -actina por qPCR se puede observar que en las muestras control la expresión disminuye de 16,5 copias/ μ l en la muestra a cero horas (inicio del ensayo) hasta 0,5 copias/ μ l a las 12 horas después de la siembra en frascos de cultivo, asimismo se observa en el tratamiento de inducción con LPS a [0,5 pg/ml] un aumento de expresión a las 12 horas (20,5 copias/ μ l) y vuelve a recaer a las 24 horas (0,49 copias/ μ l), mientras que en el tratamiento de inducción con LPS a [1,0 pg/ml] el nivel de expresión del gen se mantiene mínimo (1,85 copias/ μ l a 4

horas y 1,37 copias/ μ l a 12 horas) y aumenta levemente hacia las 48 horas (3,71 copias/ μ l) (gráfico 01). Esto indica que el nivel de expresión del gen β -actina se ve afectado frente a una inducción con LPS en el tiempo.

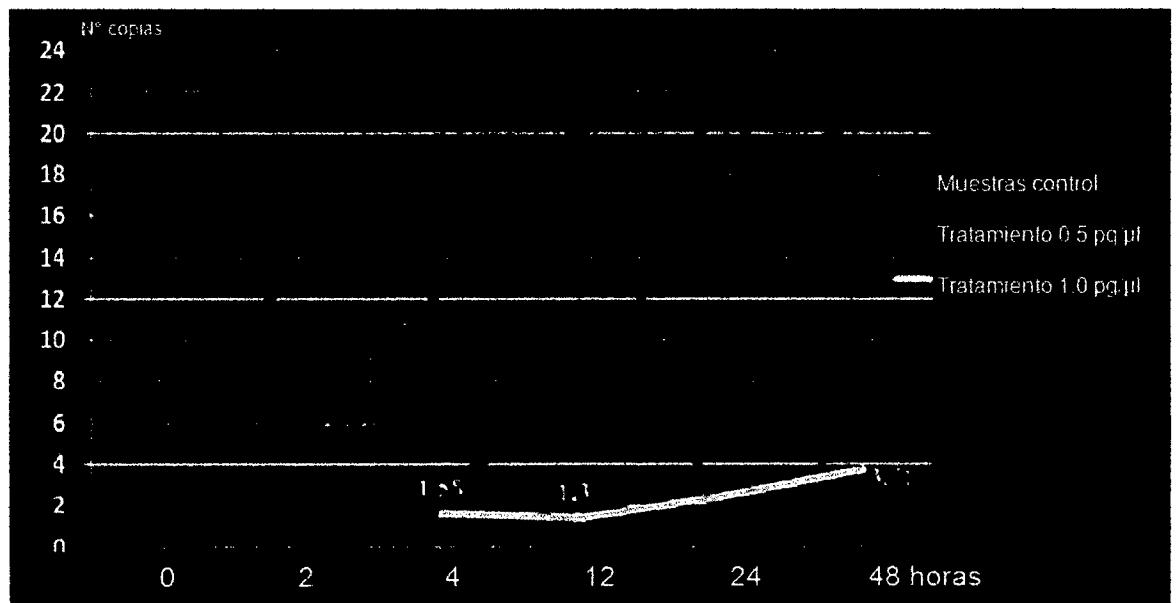


Fig. 06: Variación del nivel de expresión del gen β -actina en muestras control y muestras inducidas con lipopolisacáridos (LPS) a 0,5 pg/ml y 1,0 pg/ml

DISCUSIÓN

La identificación del gen β -actina se realizó utilizando el programa bioinformático BLAST, y se halló un patrón altamente conservado del gen, confirmando que todos los miembros de la familia multigénica de actina se encuentran muy conservados (Bertola *et al.*, 2008).

Se realizó la evaluación del gen β -actina en *Arapaima gigas* “paiche” como control interno de PCR en tiempo real (qPCR), el resultado obtenido de ésta evaluación demostró que el gen β -actina no se expresa uniformemente, es decir posee una variación en el tiempo y en los diferentes tratamientos, inclusive en las muestras control; la razón de la expresión en diferentes niveles no está clara; se puede suponer, en el caso de las muestras control la disminución del nivel de ARNm de β -actina puede deberse a un caso de muerte en el cultivo de células.

En el caso de las muestras inducidas con LPS [0,5 pg/ml] en que se observa un incremento del nivel de ARNm de β -actina a las 12 horas post inducción (PI) puede deberse a una proliferación celular (principio de respuesta inmunitaria) inducida por el LPS la cual va a decaer al cabo de 24 horas PI, debido a que el medio no puede mantener el crecimiento celular en el cultivo; al respecto en éste último punto algunos autores como Finlay *et al.*, (1988);

Finlay *et al.*, (1992); Knutton *et al.*, (1989); Manjarrez *et al.*, (1992), indican que los patógenos intestinales como *E. coli*, *Shigella*, *Listeria*, y *Yersenia*, son conocidos por interactuar con actina y ellos inducen la polimerización de actina en células epiteliales, sin embargo, los alcances de la interacción de *E.coli* con células sanguíneas no son conocidas, asimismo, se reporta que los niveles de ARNm de β -actina varía en respuesta a estimulación con ésteres de forbol e interferon gamma (Hansson *et al.*, 1989; Knutton *et al.*, 1989), pero la variación en respuesta a bacterias no está del todo dilucidada asimismo Hedges *et al.*, (1994) reportan un decremento del ARNm de β -actina en cultivo de células uroepiteliales pero no aclaran la razón de dicho decremento.

En los tejidos estudiados tanto para realizar la identificación del gen (tejido hepático) como para realizar la pruebas de expresión (tejido sanguíneo), se encontró que el gen β -actina se expresa constitutivamente sin necesidad de inducción ya que el transcrito de este gen cumple funciones vitales dentro de las células, comparando con lo expuesto por Venkatesh (1996) y Zabaleta *et al.*, (2008), exponen que el gen β -actina posee expresión constitutiva puesto que es transcripcional y traduccionalmente activa en todas las células, independiente del tejido, órgano, edad u otra condición del organismo; sin embargo, se debe resaltar que se encontró que su expresión varía frente a los tratamientos, así como lo expresa Su *et al.*, (2011), que realizaron

estudios de evaluación de genes como control interno en tejidos y cultivos celulares en carpa, y determinaron que en los tejidos branquiales, riñón, hígado, corazón, músculo y bazo, el gen 18S rRNA poseen una mayor estabilidad de expresión que el gen EF1a y éste a su vez que GAPDH y finalmente β -actina el cual es el más variable; mientras que, si el cultivo celular es estimulado con Poly (I:C) el orden de la estabilidad de expresión es EF1a> β -actin>18S rRNA>GAPDH, además Fernandes *et al.*, (2008) realizaron estudios de genes de referencia β -actina (ACTB), tubulina 2 β 18S rRNA, factor elongación 1 alpha (EF1A), y gliceraldehido 3-fosfato deshidrogenasa (GAPDH), en *Hippoglossus hippoglossus* encontrando que de los 6 genes evaluados β - actina (ACTB) y tubulina 2 β son los que se expresan con mayor estabilidad en diferentes estados de desarrollo; además McCurley y Callard (2008) realizaron la caracterización de genes housekeeping en *Danio rerio* en diferentes tipos de tejidos, etapas de desarrollo y tratamiento químico, hallando que el gen β -actina junto con los genes tubulin alpha 1 y efa se expresan con mayor estabilidad en comparación con los genes TATAbox binding protein (tbp), beta-2-microglobulin y 18S esto es contrario a lo que se encontró en éste trabajo donde se observa una variación importante en los niveles de expresión del gen β -actina en el tiempo y tipo de tratamiento en cultivos de células sanguíneas de *A. gigas*.

CONCLUSIONES

Se evaluó la expresión del gen β -actina en *Arapaima gigas* y se observó que varía frente a tratamientos con LPS y en relación al tiempo en cultivos de células sanguíneas; por lo cual no se recomienda su uso como control interno de PCR en tiempo real (qPCR).

Se logró identificar el gen β -actina en *Arapaima gigas* a partir de tejido hepático.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alcántara F. Observaciones sobre el comportamiento reproductivo del paiche, *Arapaima gigas*, en cautiverio. Folia Amazónica IIAP. [en línea] 1990. [citado el 20 de julio del 2012]; 2:163-166.URL Disponible en: http://www.iiap.org.pe/Upload/Publicacion/Folia2_articulo9.pdf
- Ambion. RI Reagent® solution Applied Biosystems RNA/DNA/ Protein Isolation Reagent part number AM9738 100ml.
- Banco Wiese Sudameris. Acuicultura aún no desarrolla su potencial productivo y de exportación. Reporte sectorial [en línea] 2002. [citado el 25 de enero del 2012], URL Disponible en: http://www.scotiabank.com.pe/i_financiera/pdf/sectorial/20021015_sec_es_acuicultura.pdf].
- Bertola L, Ott E, Griepsma S, Vonk F, y Ch Bagowski. Developmental expression of the alpha-skeletal actin gene. BMC Evolutionary Biology. [en línea] 2008. [citado el 25 de enero del 2012], Disponible en: <http://www.biomedcentral.com/1471-2148/8/166>.
- Carazo V, y Y. Guzmán. Manual de piscicultura del paiche. [en línea]. 1999 [citado 2012 Ene 25]; URL Disponible en: <http://www.promamazonia.org.pe/SBiocomercio/Upload%5CLineas%5C Documentos/356.pdf>.

- Carrillo E, Hernández R, Suárez F, De la Peña A. Selection of the internal control gene for real-time quantitative RT-PCR assays in temperature treated *Leptospira*. *Curr Microbiol* (2008) 56:539–546.
- Choi C, y F. Takashima. Rapid communication: nucleotide sequence of red seabream, *Pagrus major*, beta-actin cDNA. *J ANIM SCI* 2000; 78 (11): 2990-1.
- Chu K y F William. Domesticación y crianza en cautiverio de *Arapaima gigas*. Manejo, aspectos reproductivos y nutricionales. [en línea] 2010. [citado el 20 de jun. 2012]; URL Disponible en: <http://www.promamazonia.org.pe/SBiocomercio/Upload%5CLineas%5C Documentos/476.pdf>
- Costa J. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a tiempo real. *Enferm Infecc Microbiol Clin* 2004; 22(5): 299-305.
- Dugué R, Chu F, Alcántara F, y J Nuñez. Purification and assay of *Arapaima gigas* vitellogenin: potencial use for sex determination. Instituto de Investigaciones de la Amazonía Peruana. *Cybiu* 2008; 32(2): 111.
- Eléspuru N, Sandoval M, y F Alcántara. Datos preliminares de los efectos del medio ambiente en la expresión de genes asociados al estrés, producción y reproducción en paiches *Arapaima gigas* (Cuvier, 1829), criados en cautiverio. BIODAMAZ, Perú – Finlandia Proyecto Diversidad Biológica de la Amazonía Peruana. [en línea] 2007; 1-12. [citado el 20 de jun. 2012]; URL Disponible en:

http://www.iiap.org.pe/biodamaz/faseii/download/literatura_gris/Articulos%20cient%C3%ADficos/10-Efectos%20del%20medio%20ambiente%20en%20la%20expresi%C3%B3n%20gen%C3%A9tica%20del%20paiche%20-%2028-11-07.pdf

Fernandes J, Mommens M, Hagen O, Babiak I, y C Solberg. Selection of suitable reference genes for real-time PCR studies of Atlantic halibut development. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol* 2008; 150(1): 23-32.

Finlay B, Rosenshine I, Donnenberg M, and J Kaper. Cytoskeletal composition of attaching and effacing lesions associated with enteropathogenic *Escherichia coli* adherence to HeLa cells. 1992. *Infect. Immun.* 60:2541-2543.

Finlay B. and S Falkow. Comparison of the invasion strategies used by *Salmonella cholerae-suis*, *Shigella flexneri*, and *Yersinia enterocolitica* to enter cultured animal cells: endosome acidification is not required for bacterial invasion or intracellular replication. 1988. *Biochimie* 70:1089-1099.

Flores E. Sectores y actividades económicas con potencialidad en la generación de empleo. Ministerio de trabajo y promoción social. Consejo nacional de trabajo y promoción social comisión de empleo [en línea] 2001. [citado el 25 de ene. del 2012], URL Disponible en:

http://www.mintra.gob.pe/archivos/file/CNTPE/sect_con_potencialidad.pdf

Gallego F. Selección del control endógenos óptimo para ensayos de expresión génica Vall d'Hebron Instituto de Recerca. [en línea] 2007. [citado el 14 de oct. 2011], URL Disponible en: http://www.ir.vhebron.net/easyweb_irvh/Portals/0/pdf/EleccindelControlEndogenoOptimoenestudiosRTqPCR.pdf.

Hansson G, Hellstrand M, Rymo L, Rubbia L, and G. Gabbiani. Interferon - γ inhibits both proliferation and expression of differentiation-specific α -smooth muscle actin in arterial smooth muscle cells. 1989. J. Exp. Med. 170:1595-1608.

Hedges S, Agace M, Svensson A, Sjogren M, Ceska and C. Svanborg. Uroepithelial cells are part of a mucosal cytokine network. Infect. Immun. 1994; 62(6): 2315-2321 [citado el 10 de agosto del 2012]. Disponible en: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC186514/>

Herman Ira. Actin isoforms. Current Opinion in Cell Biology 1993; 5(1):48-55.

Hwang U, Han M, Kim I, Lee Y, Aoki Y, y J Lee. Cloning and sequences of beta-actin genes from *Rhodeus notatus* and the silver carp *Hypophthalmichthys molitrix* (cyprinidae) and the phylogeny of Cyprinid fishes inferred from beta-actin genes. DNA Seq. 2002;13 (3):153-9.

IUCN. The IUCN Red List of Threatened Species [en línea] [citado el 29 de mayo del 2012]. URL Disponible en: <http://www.iucnredlist.org/>

Knutton S, Baldwin T, Williams P, and A McNeish. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. 1989. *Infect. Immun.* 57:1290-1298.

Lázaro F. Implicación de los filamentos de actina en la arquitectura, homeostasis y tráfico de salida del aparato de golgi y estudio de la formación y degradación de un agresoma de actina. [Tesis doctoral]. Departamento De Biología Celular y Anatomía Patológica, Facultad de Medicina. Barcelona. 2008.

Lee J. The Internally Self-fertilizing Hermaphroditic Teleost *Rivulus marmoratus* (*Cyprinodontiformes*, *Rivulidae*) b-Actin Gene: Amplification and Sequence Analysis with Conserved Primers. *Mar. Biotechnol.* 2000; 2:161–166.

Liang X, He S, y D Shen. Molecular characterization of b-actin gene in Chinese perch *Siniperca chuatsi* (Basilewsky). *Aquaculture Research* 2011; 42: 1476-1486

Liu Z., Zhu Z., Roberg K, Faras A, Guise K, Kapuscinski A, y P Hackett. Isolation and characterization of beta-actin gene of carp (*Cyprinus carpio*). *J. of DNA Sequencing and Mapping.* 1990; 1(2): 125-36.

Lowe-McConnell R. *Ecological Studies in Tropical Fish Communities* Cambridge University [en línea]. 1995. [citado el 29 de may. del 2012].

ULR Disponible en:

<http://books.google.com.pe/books?hl=es&lr=&id=Eu0T9mDiwnwC&oi=fnd&pg=PR11&dq=Ecological+Studies+in+Tropical+Fish+Communities>

Luque J y A. Erráez. Texto ilustrado de biología molecular e ingeniería genética, conceptos, técnicas y aplicaciones a las ciencias de la salud. Edit. Harcourt, 2001; 469.

Manjarrez H, Baldwin T, Aitken A, Knutton S, and P Williams. Intestinal epithelial cell protein phosphorylation in enteropathogenic *Escherichia coli* diarrhoea. 1992. *Lancet* 339:521-523.

Mas E, Poza J, Ciriza J, Zaragoza P, Osta R, y C Rodellar. Fundamento de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). *AquaTIC*. [en línea] 2001; 15. [citado el 14 de oct. Del 2011]. URL Disponible en URL: <http://www.revistaaquatic.com/aquatic/art.asp?t=h&c=128>

McCurley A y G Callard. Characterization of housekeeping genes in zebrafish: male-female differences and effects of tissue type, developmental stage and chemical treatment. *Rev. BMC Molecular Biology* 2008, 9:102.

Minag, Informe de seguimiento agroeconómico (ISA). Ministerio de agricultura [en línea] 2011. [citado el 25 de enero del 2012]. URL Disponible en: http://www.minag.gob.pe/portal/download/pdf/herramientas/boletines/bol-etineselectronicos/isa/2011/isa_set2011.pdf

Ministerio de la producción. Situación actual de la acuicultura en el Perú. [en línea] 1993. [citado el 25 de enero del 2012]. URL Disponible en: <http://www.produce.gob.pe/RepositorioAPS/3/jer/ACUISUBMENU4/boletines/SITUACI%C3%93N%20ACTUAL%20DE%20LA%20ACUICULTURA%20EN%20EL%20PER%C3%9A.pdf>.

Mullis, K. y F Faloona. Specific synthesis of DNA in vitro via polimerase chain reaction. Meth. Enzymol. 1987; 155: 335-350.

Pray L., The Biotechnology Revolution: PCR and the Use of Reverse Transcriptase to Clone Expressed Genes. Nature Education [en línea]. 2008 [citado el 14 de Oct. del 2011] URL Disponible en: <http://www.nature.com/scitable/topicpage/the-biotechnology-revolution-pcr-and-the-use-553>

PromPerú-Sunat. Potencialidades de la acuicultura. 2011 [citado el 25 de enero del 2012]. URL Disponible en: http://www.comexperu.org.pe/archivos%5Crevista%5Cmarzo08%5Cespecial_acuicultura.pdf.

Rodríguez M. Secuenciación de genes relacionados asociados a la diferenciación sexual en el pez blanco de Patzcuaro *Menidia estor*. [Tesis de pregrado] Universidad Michoacana de san Nicolás de Hidalgo. Michoacán, México; 2011.

Sandoval M. Aspectos de manejo, reproducción y alimentación del paiche (*Arapaima gigas*) en la Amazonía peruana. Instituto de Investigaciones

- de la Amazonía Peruana – IIAP. [en línea] 2007. [citado el 20 de julio del 2012]; 2:163-166.URL Disponible en: http://www.iiap.org.pe/biodamaz/faseii/download/literatura_gris/Documentos%20T%C3%A9cnicos/8%20-%20Documento%20paiche%20-%2028-11-07.pdf
- Santos A. y C Duarte. Validation of internal control genes for expression studies: effects of the neurotrophin BDNF on *Hippocampal neurons*. J Neurosci Res. 2008; 86: 3684–3692.
- Santos C, Power D, Kille P, Llewellyn L, Ramsurn V, Wigham T, y G Sweeney. Cloning and sequencing of a full-length sea bream (*Sparus aurata*) beta-actin cDNA. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 1997; 117(2):185-9.
- Schmittgen T, y B Zakrajsek. Effect of experimental treatment on housekeeping gene expression: validation by real-time, quantitative RT-PCR. J Biochem Biophys Methods. 2000; 20;46 (1-2): 69-81.
- Sellayah D, Sek K, Anthony F, Hanson M, y F Cagampang. Sensitivity Of Housekeeping Genes In The Hypothalamus To Mismatch In Diets Between Pre- And Postnatal Periods In Mice. Neuroscience Letters 2008; 447(1): 54-57.
- Su Y, Zhang R, Dong J, y Ch Yang. Evaluation of internal control genes for qRT-PCR normalization in tissues and cell culture for antiviral studies of

- grass carp (*Ctenopharyngodon idella*). Fish & Shellfish Immunology 2011; 30: 830-835.
- Tevfik M. Real Time PCR. Edit Taylor & Francis Group. 2006. (Citado el 14 de jun. del 2012). URL Disponible en: <http://www.xdtrans.com/uploads/101201/Real-time%20PCR.pdf>.
- Tsuji N, Kamagata C, Furuya M, Kobayashi D, Yagihashi A, Morita T, Horita S, y N Watanabe. Selection of an internal control gene for quantitation of mRNA in colonic tissues. Anticancer Res. 2002; 22(6C): 4173-8.
- Venkatesh B, Tay B, Elgar G y S Brenner. Isolation, characterization and evolution of nine pufferfish (*Fugu rubripes*) actin genes. J. Mol. Biol. 1996; 259: 655–665.
- Xu L, Ma X, Cui B, Li X, Ning G, y S Wang. Selection of Reference Genes for qRT-PCR in High Fat Diet-Induced Hepatic Steatosis Mice Model. Mol Biotechnol 2011; 48: 255–262.
- Yan J, Yuan F, Long G, Qin L, y Z Deng. Selection of reference genes for quantitative real-time RT-PCR analysis in citrus. Mol Biol Rep 2012; 39:1831–1838.
- Zabaleta M, Yaya M, y A. Chaparro. Comparación de dos kits de RT-PCR en la detección de ARNm de dos genes endógenos de papa (*Solanum tuberosum* spp. *andígena*) Universidad Nacional de Colombia Bogotá, Colombia. Colombiana de Biotecnología, 2008; X(2):104-110.

Zhang M, Zhang Y, Zhang L, Wang S, Zhu T, Lin D, y G. Ma. Nucleotide sequence and mRNA expression analysis of b-actin gene in the orange-spotted grouper *Epinephelus coioides*. Fish Physiology and Biochemistry 2005; 31: 373–383.

ANEXOS

Cuadro 02: Iniciadores utilizados para la amplificación y secuenciación del gen β -actina en *Arapaima gigas*

Iniciador		Longitud del amplicón
β -actina*	SGAF86	135pb
	SGAR87	
pGEM-T Easy	pUC/M13 Forward	370pb**
	pUC/M13 Forward	

*Tomados de la publicación Su *et al.* 2009.

**Tamaño del amplicón del plásmido incluido el inserto de interés.

1. Transformación bacteriana

1.1 Comprobación en placa de bacterias transformadas: para la comprobación de la transformación se realizó la siembra en placa sobre agar Luria Bertani (agar-LB: cloruro de sodio 1%, triptona 1%, extracto de levadura 5%, agar 1,5%) combinado con IPTG y X-Gal,

1.2 Cuantificación de ADN plasmídico: se cuantificó la concentración de ADN plasmídico, con el kit para cuantificación Qubit® ARN Assay utilizando el equipo Qubit® fluorometer 2.0. luego utilizando la fórmula

descrita a continuación de halló la concentración del número de copias del plásmido; finalmente se realizó diluciones sucesivas (1:10) del ADN plasmídico para la creación de la curva estándar.

$$Y \text{ moléculas}/\mu\text{l} = \frac{(X_{\text{gr}} / \mu\text{l DNA}) \times N^{\circ} \text{ de Avogadro}}{(\text{Long. Plásmido en pares de bases}) \times (\text{medida en moles del peso de una base}^*)} \dots (1)$$

* Esto para el caso de templado de doble cadena se reemplaza 660 gr/mole/base.

(1) Tevfik , (2007).

Hallando el número de copias por μl en el ADN plasmídico

Datos:

Longitud del plásmido sólo = 3015pb

Longitud del inserto = 135pb

Concentración del ADN plasmídico = $67.8 \times 10^{-9} \text{ gr}/\mu\text{l}$

Aplicando la fórmula (1)

$$Y \text{ moléculas}/\mu\text{l} = \frac{(67.8 \times 10^{-9} \text{ gr}/\mu\text{l}) \times (6.023 \times 10^{23} \text{ moléculas})}{(3150 \text{ pb}) \times (660 \text{ gr/mole/base})}$$

$$Y = 1.9638 \times 10^{10} \text{ moléculas}/\mu\text{l}$$

Los datos mostrados en el cuadro 03 son el resultado de la cuantificación del ARN extraído de las muestras de sangre de los cultivos in vitro.

Cuadro 03: Datos de cuantificación del ARN extraído

<div> <div>cuantificación</div> <div>Tratamiento/Tiempo</div> </div>			ng/μl
Control	0h	x	108
	12h	x	88
0.5pg/ml	2h	x	15
	6h	x	74,8
	12h	x	5,2
	24h	x	6,6
1.0pg/ml	4h	x	20,4
	12h	x	51
	12h	x	12,2
	24h	x	72,2
	48	x	38,2

2. PCR en tiempo real (qPCR)

2.1 Curva estándar: En la obtención de la curva estándar se utilizó las diluciones seriadas del plásmido de β -actina 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} obteniéndose la siguiente curva estándar.

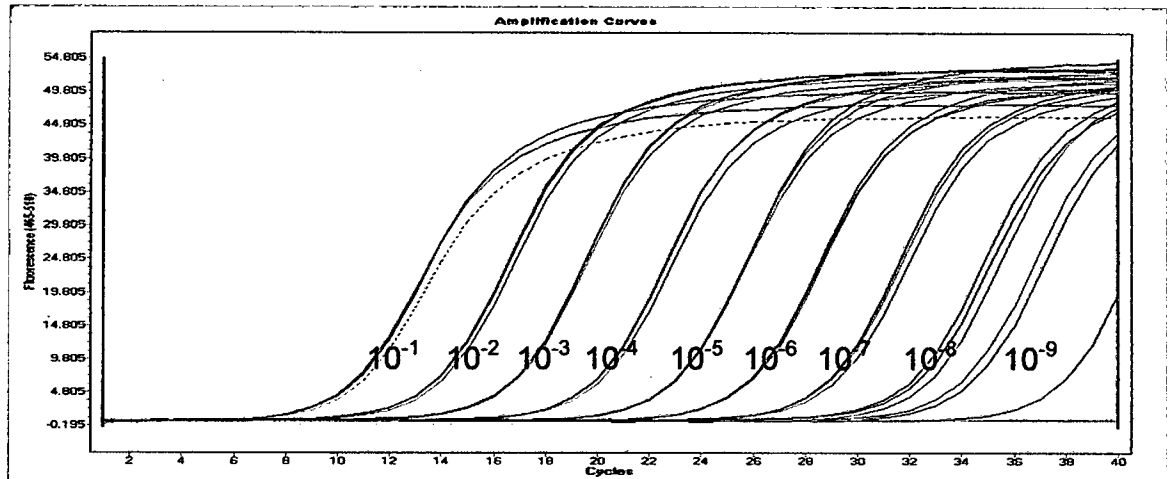


Fig. 07: Curvas de amplificación sigmoideal del total de las diluciones seriadas del plásmido de β -actina

Del total de las diluciones se tomaron cinco datos 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} y 10^{-8} para la creación de la curva estándar.

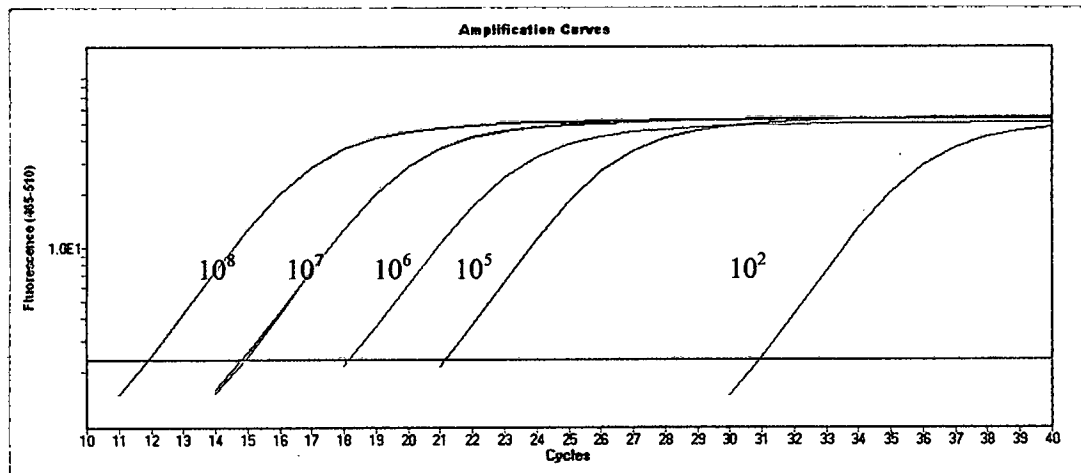


Fig. 08: Curvas de amplificación en modo logarítmico de las diluciones tomadas para la creación de la curva estándar.

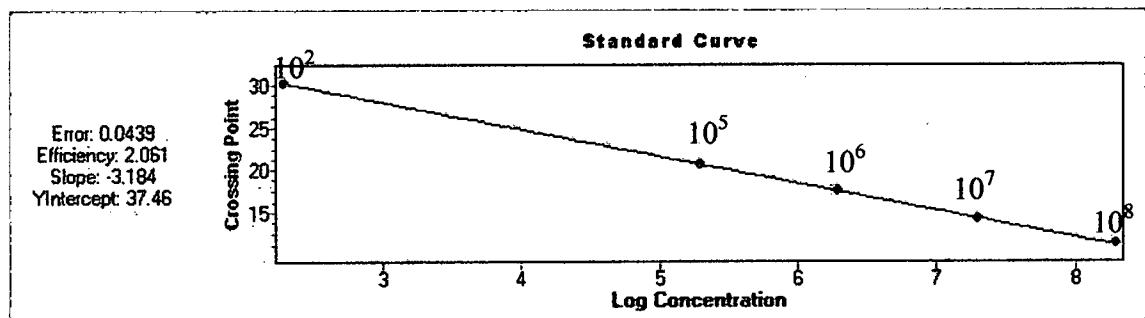


Fig. 09: Curva estándar mostrando los datos de eficiencia (2.061), pendiente de (-3.184) y el error (0.0439).

El número de copias teórico y la cuantificación del número de copias real de las diluciones usadas para la creación de la curva estándar se muestran en la tabla siguiente:

Cuadro 04: Número de copias teórico y número de copias reales halladas por cuantificación del plásmido por qPCR.

Dilución	# copias Teórico	# copias Real
10^{-2}	1.96×10^8	1.78×10^8
10^{-3}	1.96×10^7	2.1×10^7
10^{-4}	1.96×10^6	1.93×10^6
10^{-5}	1.96×10^5	2.18×10^5
10^{-8}	1.96×10^2	1.85×10^2

Evaluación de las muestras

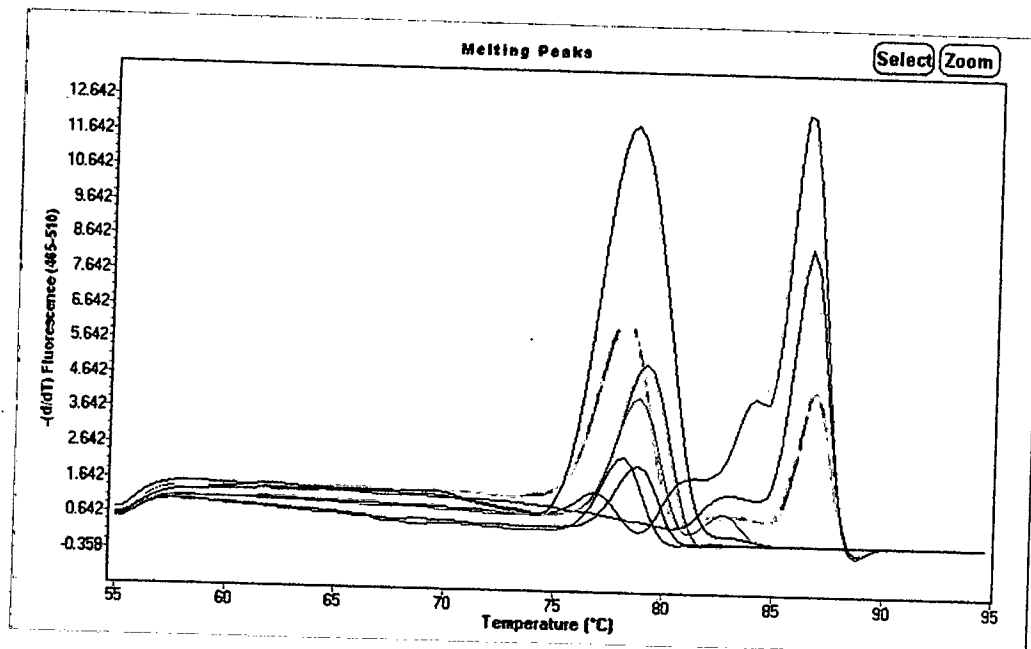


Fig. 10: Curvas de disociación (curvas melting) de las muestras problema.

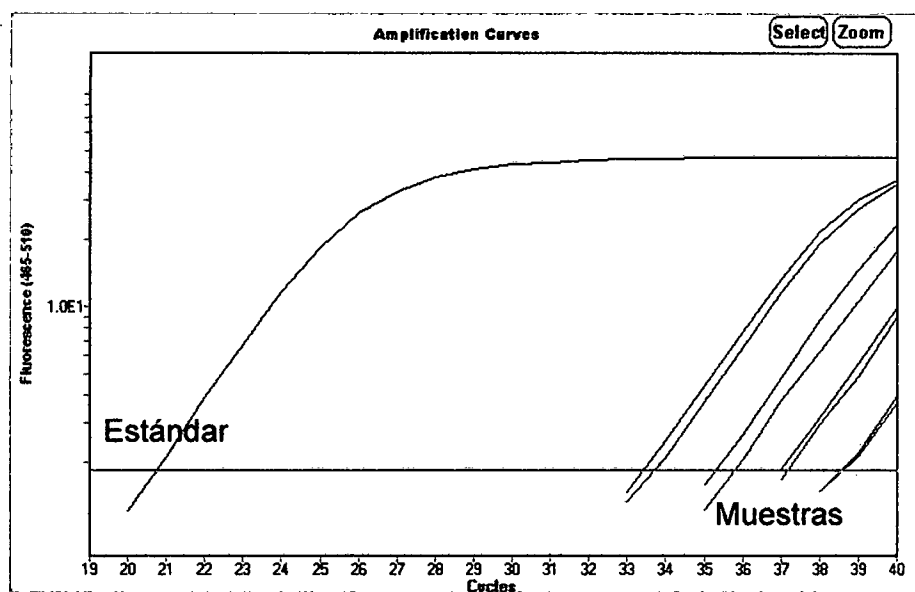


Fig. 11: Curva logarítmica de amplificación (fluorescencia vs número de ciclos) de las muestras problema.

Cuadro 05: Número de muestras y cuantificación absoluta del número de copias inicial.

concentración del inductor (LPS pg/ml)	Tiempo (horas)	CP	Cuantificación del N° de copias inicial
Control	0	33.69	16.5
	12	38.5	0.508
0.5	2	35.25	5.36
	12	33.39	20.5
	24	38.54	0.496
1.0	4	36.94	1.58
	12	37.13	1.37
	48	35.75	3.71